

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名 (本国籍)     | 佐 藤 一 臣 (静岡県)  |
| 学 位 の 種 類     | 博士 (農学)  |
| 学 位 記 番 号     | 農博甲第 504 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 21 年 3 月 13 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 3 条第 1 項該当   |
| 研 究 科 及 び 専 攻 | 連合農学研究科<br>生物生産科学専攻  |
| 研究指導を受けた大学    | 静岡大学   |
| 学 位 論 文 題 目   | B16 メラノーマのメラニン生成における各種生理活性物質の作用機構に関する研究  |
| 審 査 委 員 会     | 主査 静岡大学 教授 鳥 山 優<br>副査 静岡大学 教授 森 誠<br>副査 岐阜大学 教授 吉 崎 範 夫<br>副査 信州大学 教授 佐々木 晋 一 |

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

メラニンとは種々の動植物に存在し、体色の構成成分として重要である。特にヒトにおいては日焼けの際に生成し、有害な紫外線を吸収することで皮膚の細胞を保護する役割を有する。メラニンは色調の違うユーメラニンとフェオメラニンとに分類される。褐色から黒色を呈するユーメラニンと赤色から黄色を呈するフェオメラニンを保有する割合によって肌の色が決まる。

メラニン生成はアミノ酸の一種、チロシンを出発物質とする一連の化学反応によって進行する。チロシンはチロシナーゼによる 2 段階の変化を受け、システインなどの SH 化合物の非存在下において、非酵素的酸化経路あるいは 2 種類のチロシナーゼ関連タンパク質 (TRP-1 及び 2) による酵素反応でインドール類を生成したのち、それらが重合してユーメラニンとなる。非酵素的経路と酵素による経路で生成するメラニンの色調が異なるため、TRP-1 及び 2 はメラニンの色調を調節する働きをもつとされる。

細胞におけるメラニン生成は、色素胞刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) がメラノソームに作用することで起こる。 $\alpha$ -MSH を受け取ったメラノソーム細胞内では cAMP 濃度が上昇し、その結果、小眼球症関連転写因子 (MITF) が発現する。MITF はチロシナーゼおよび TRP-1, 2 の転写因子として働き、その結果、これらの 3 酵素の発現が起こり、メラニン生成が亢進する。

人体におけるメラニン生成の制御は、色素異常を引き起こす病気の治療ならびに化粧品開発において重要なテーマである。現在、化粧品に配合されているメラニン生成阻害物質は、ビタミン C など、チロシナーゼ活性阻害剤であるため、その効果が一過的である。そのため、持続的効果を有する生理活性物質の探索が必要とされる。

本論文では、新規のメラニン生成阻害物質として、ビタミン A 類 2 種、ピロロキノリン

キノン (PQQ), 5種の非ステロイド系抗炎症薬について報告し, それらの作用機構を明らかにしている。α-MSHによりメラニン生成を誘発する実験系を用いた調査から, 8種類の生理活性物質はいずれもチロシナーゼ活性の阻害作用はないか, あるとしても, それ以外の作用点を有する物質であることが明らかとなった。

ビタミンA類はレチノイン酸とレチノールの効果を調べた。2種の薬剤で効果の違いはあるものの, いずれもチロシナーゼ活性には影響を与えず, チロシナーゼの発現抑制を引き起こした。PQQも同様にチロシナーゼ活性を抑えることなく, チロシナーゼ発現を抑えた。5種の非ステロイド系抗炎症薬として, アセチルサリチル酸, メフェナム酸, ニメスリド, ジクロフェナク, ピロキシカムを用いて実験を行った。メフェナム酸, ニメスリド, ジクロフェナクにはチロシナーゼ活性阻害作用が見られたが, ピロキシカムを除く4種の薬剤でチロシナーゼの発現阻害も見られた。これらのことから, 以上の8種類の生理活性物質は, 今後, 新規の持続型メラニン生成阻害剤として, 製薬ならびに化粧品開発への応用が見込まれる。

本論文においては, 8種類の生理活性物質がチロシナーゼ以外の関連タンパク質の発現に及ぼす影響についても調査した。TRP-1の発現はチロシナーゼと同調することが多いが, TRP-2についてはα-MSHによる刺激を受けても, その発現量があまり変動せず, 調査に用いた生理活性物質の影響もあまり受けなかった。ビタミンA類を除く6種の生理活性物質においては, MITFの発現量の変化についても調査した。α-MSHによりMITFの発現の一過的な上昇が見られ, それから遅れてチロシナーゼとTRP-1の発現増加が見られたものの, TRP-2の発現はあまり増加しなかった。また, 生理活性物質添加後の変化についても, MITF, チロシナーゼ, TRP-1, 2の間で, その発現量の増減について一致する傾向が見られなかった。

以上のことから, チロシナーゼおよび関連タンパク質について提唱されてきた発現制御機構について再検討する必要があると考えられる。α-MSH刺激によりスタートするシグナル伝達経路がMITFの発現を引き起こし, その結果, チロシナーゼ関連3酵素の発現を増加させる結果, メラニン生成が起こるというこれまでの機構に加え, チロシナーゼ関連3酵素それぞれの発現について, MITF以外の転写調節因子が存在し, 3酵素は別々に制御されていると考える必要があると言える。

本論文では使用した5種の非ステロイド系抗炎症薬すべてにメラニン生成阻害効果があることがわかったが, 非ステロイド系抗炎症薬の本来の働きであるプロスタグランジン生成阻害とメラニン生成阻害との関係など, さらに研究を進めなければならない面もある。しかし本論文は, 医薬品並びに化粧品開発へ応用できる新規物質を提示し, さらに, メラニン生成におけるシグナル伝達および転写制御機構に新たな探求課題を提示したことで, 基礎科学および応用科学の両面において今後の発展的な研究につながっていくものと言える。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文はビタミンA類, ピロロキノリンキノン, 5種の非ステロイド系抗炎症薬がマウスB16メラノーマ細胞のメラニン生成に与える影響とその作用機構についてとりまとめたものである。

ビタミンA類としてはレチノイン酸 (ATRA) およびレチノールの2種, 非ステロイド系抗炎症薬としてはアセチルサリチル酸, メフェナム酸, ニメスリド, ジクロ

フェナク、ピロキシカムの5種、それにピロロキノリンキノンを加えた計8種類の生理活性物質が $\alpha$ -MSHによって引き起こされるメラノーマ細胞のメラニン生成を抑えることをまず確認した。次いで、メラニン生合成経路の第一反応にかかわる酵素であるチロシナーゼの発現量ならびに酵素活性について調べ、ピロキシカムを除く7種の物質がチロシナーゼの細胞内発現を濃度依存的に抑制することを明らかにした。さらに、メラニン生成経路にかかわる別の酵素であるチロシナーゼ関連タンパク質1および2 (TRP-1, 2) の発現、ならびに、チロシナーゼ、TRP-1, 2に共通する転写調節因子として知られている小眼球症関連転写因子 (MITF) の転写に関しても調査し、メラニン生成に関与する3つの酵素が、MITFだけで制御されるわけではないという可能性を見出した。

メラニン生成の阻害物質は化粧品等に応用されるが、ビタミンCやアルブチンなど、そのほとんどがチロシナーゼ活性の阻害剤である。本論文ではチロシナーゼ活性よりもチロシナーゼ発現制御に焦点をあて、その作用を有する物質を多く見出しただけでなく、それぞれの生理活性物質の作用点に関して広く考察を行い、チロシナーゼ関連タンパク質の発現調節について考えられていた従来の機構では説明できない点を明示した。基礎科学においては、細胞内シグナル伝達に関する研究の新しい側面を提示し、一方、応用科学においては、これらの生理活性物質による新たな化粧品・医薬品の開発への道を切り開いた。

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席のもとに、平成21年1月20日(火)午後1時30分より、静岡大学農学部B棟210教室において実施された。発表の内容は充実しており、本申請者は質問に対してほぼ的確に応答した。

終了後、引き続き論文内容を中心に審査委員会を開催し審議を行った。審査委員会において、本論文は、多岐にわたる知識と実験手法を駆使してB16メラノーマのメラニン生成における各種生理活性物質の作用機構を明らかにしたもので、得られた知見は学術的に高い価値のあるものと判定された。また、論文の構成は論理的であり、内容は独創性に富み、結果に対する科学的考察も十分になされていると判断された。

慎重に審議した結果、以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

Down-Regulation of Tyrosinase Expression by Acetylsalicylic Acid in Murine B16 Melanoma. Biol.Pharm.Bull (2008) Vol 31 pp33-37 Kazuomi Sato, Hideki Takahashi, Remina Iraha and Masaru Toriyama

Depigmenting Mechanism of All-Trans Retinoic Acid and Retinol on B16 Melanoma Cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2008) Vol 72 pp 2589-2597 Kazuomi Sato, Masayuki Morita, Chihiro Ichikawa, Hideki Takahashi and Masaru Toriyama

Effect of pyrroloquinoline quinine (PQQ) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma. J. Dermatol. Sci. (2009) Vol 53 pp 140-145 Kazuomi Sato and Masaru Toriyama